

## SCAMP2基因敲除小鼠子代基因型的鉴定与繁殖

梁钰敏<sup>1</sup>, 张飞龙<sup>1</sup>, 丁航<sup>1</sup>, 马卫列<sup>1</sup>, 陈小芳<sup>2</sup>, 张志珍<sup>1\*</sup> (广东医科大学 1. 生物化学与分子生物学教研室; 2. 医学检验实验技能示范中心, 广东东莞 523808)

**摘要:** 目的 探讨SCAMP2基因敲除小鼠的繁殖方式及其基因型鉴定。方法 将引进的SCAMP2基因敲除小鼠饲养于SPF级环境内, 采用PCR方法鉴定基因型。采用杂合子互交、杂合子与纯合子正交及反交、纯合子互交4种方法繁殖, 观察子代小鼠外形特征并计算纯合率。结果 野生型小鼠SCAMP2<sup>+/+</sup>、杂合子SCAMP2<sup>+/-</sup>、纯合子SCAMP2<sup>-/-</sup>分别在153 bp、153 bp和344 bp、344 bp处出现扩增条带。杂合子互交、杂合子与纯合子正交及反交、纯合子互交方式所产子代小鼠的纯合率分别为29.17%、46.15%、55.56%和100.00%。结论 成功鉴定了SCAMP2基因敲除小鼠的基因型, 纯合子互交方式是获得SCAMP2纯合子小鼠的较好方法。

**关键词:** SCAMP2; 基因敲除; 基因型鉴定; 繁殖

中图分类号: Q 953

文献标识码: A

文章编号: 2096-3610(2017)06-0610-04

### Genotype identification and breeding of Scamp2 gene knockout mice

LIANG Yu-min<sup>1</sup>, ZHANG Fei-long<sup>1</sup>, DING Hang<sup>1</sup>, MA Wei-lie<sup>1</sup>, CHEN Xiao-fang<sup>2</sup>, ZHANG Zhi-zhen<sup>1\*</sup>

(1. Department of Biochemistry and Molecular Biology; 2. Experimental Skills Demonstration Center for Laboratory Medicine; Guangdong Medical University, Dongguan 523808, China)

**Abstract:** Objective To study the mating pattern and genotype identification of SCAMP2 gene knockout mice. Methods The introduced SCAMP2 gene knockout mice were bred in SPF environment, and their genotypes were identified by PCR. The physical appearance and homozygote rate of the offspring were observed after produced by heterozygous, orthogonal and reverse, and homozygous mating. Results The amplified bands were present at 153 bp for wild type SCAMP2<sup>+/+</sup> mice, 153/344 bp for heterozygous SCAMP2<sup>+/-</sup> mice, and 344 bp for homozygous SCAMP2<sup>-/-</sup> mice. The homozygote rates of the offspring were 29.17%, 46.15%, 55.56%, and 100.00% for heterozygous, orthogonal and reverse, and homozygous mating, respectively. Conclusion The genotypes of SCAMP2 gene knockout mice are successfully identified. The homozygous mating is sufficient for breeding homozygous SCAMP2<sup>-/-</sup> mice.

**Key words:** SCAMP2; gene knockout; genotype identification; breeding

膜泡运输是内膜系统间的物质传递方式。细胞内蛋白质、脂质等被运输物质被分选并包裹成含COP(coatmer protein)的运输囊泡(transport vesicles), 进一步在高尔基体网络加工转变为分泌囊泡(secretory vesicles)。分泌囊泡移动到细胞膜附近, 并且通过囊泡膜与细胞膜融合将蛋白质、脂质等胞吐至细胞外<sup>[1-2]</sup>。囊泡运输至接近细胞膜时需要与细胞膜锚定和融合, 膜融合主要是由小分子的SNARE(soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein attachment protein receptor)跨膜蛋白所介导<sup>[3]</sup>。SCAMP2(secre-

tory carrier membrane protein 2)是一种含有四个跨膜区的膜整合蛋白, 存在于质膜、分泌小泡中, 与SNARE及突触融合蛋白复合物结合。这些蛋白复合物的相互作用形成了融合孔, 参与胞吐过程, 是调节囊泡分泌通路的关键<sup>[4-5]</sup>。

基因敲除小鼠具有能够从动物整体水平上探究相关基因在体内功能的优势, 为了更好地研究SCAMP2在细胞内囊泡运输过程中的作用及其机制, 本课题组从美国Jackson实验室引进两对SCAMP2基因敲除小鼠, 饲养于符合国家标准的环境中, 成功进行了基因型鉴定, 并通过繁殖获得了一定数量的SCAMP2基因敲除小鼠, 为后续研究提供了实验基础。

### 1 材料和方法

收稿日期: 2017-09-20; 修订日期: 2017-10-02

作者简介: 梁钰敏(1994-), 女, 硕士生。

\*通信作者: 张志珍(1967-), 女, 博士, 教授, E-mail:

zzzhang@gdmu.edu.cn。

### 1.1 实验动物与材料

SCAMP2基因敲除小鼠引自美国 Jackson Laboratory(Maine, USA), 库存号: 028970。4只SPF级C57BL/6NJ-*Scamp2*<sup>em1J</sup>品系小鼠, 8周龄, 雌雄各半, 雄鼠体质量分别为23.97 g和23.60 g, 雌鼠体质量分别为21.32 g和21.62 g。遗传背景为SCAMP2基因敲除杂合子(SCAMP2<sup>+/-</sup>)。

2×Easy Taq PCR Super Mix、6×Loading buffer、100 bp DNA ladder购自北京全式金生物技术有限公司; PCR引物由上海生工生物工程股份有限公司合成; 琼脂糖购自上海伯奥生物科技有限公司。其他试剂均为国产或进口分析纯。

### 1.2 方法

1.2.1 小鼠饲养 SCAMP2基因敲除小鼠按照SPF级动物饲养标准进行饲养。屏障环境内温度控制在22~25℃, 相对湿度控制在55%~65%, 自由饮食进水, 昼夜光照节律。小鼠饲料、饮用水、垫料、鼠笼均经高压高温消毒处理。垫料每周更换2次, 饲料及饮水每日补充。

1.2.2 小鼠繁育 引进的SCAMP2基因敲除杂合子小鼠(SCAMP2<sup>+/-</sup>)适应性喂养2周后, 将雄性与雌性小鼠按1:1合笼配对, 各繁殖2胎获得27只子鼠。按照1:1/1:2的雄雌比例进行二代子鼠的合笼繁殖, 获得较多数不同基因型子鼠, 再将不同基因型性成熟雌雄小鼠按以下四种方式1:1配对分组: (1)雄性杂合子SCAMP2<sup>+/-</sup>与雌性杂合子SCAMP2<sup>+/-</sup>配对; (2)雄性杂合子SCAMP2<sup>+/-</sup>与雌性纯合子SCAMP2<sup>-/-</sup>配对; (3)雄性纯合子SCAMP2<sup>-/-</sup>与雌性杂合子SCAMP2<sup>+/-</sup>配对; (4)雄性纯合子SCAMP2<sup>-/-</sup>与雌性纯合子SCAMP2<sup>-/-</sup>配对, 每组5对, 均交配两个月。观察记录子代小鼠的外形特征, 并计算纯合率。

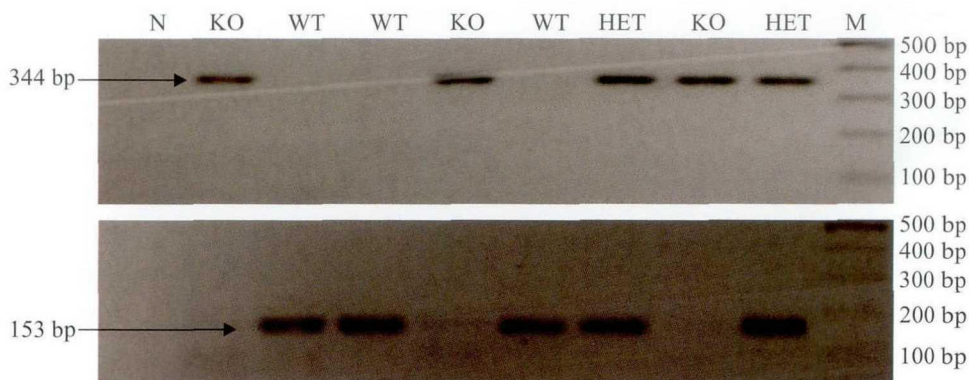
1.2.3 基因型鉴定 (1)鼠耳组织DNA的提取: 利用

打耳钳取3周龄鼠小片耳组织于Ep管中, 加入50 mmol NaOH溶液75 μL煮沸10 min后, 加入1 mol Tris-Hcl(pH=8.0)溶液25 μL, 以3 000 r/min离心5 min, 取上清于-20℃冰箱备用。(2)PCR扩增反应: 通用引物(Commo): 5'--AGAGCCCTGCAAGGACT GAG--3'; 野生型引物(Wild type reverse): 5'--ACTT CACCCAGGCAGGAAG--3'; 突变型引物(Mutant reverse): 5'--TTCTGAGCTGGGAAGGAATG--3'。Reaction A的PCR反应体系为10 μL: 2×Easy Taq PCR Super Mix 5 μL, 模板DNA 2 μL, 5 μmol/L的Commo和Wild type reverse各0.2 μL, ddH<sub>2</sub>O 2.6 μL。Reaction B的PCR反应体系为10 μL: 2×Easy Taq PCR Super Mix 5 μL, 模板DNA 2 μL, 5 μmol/L的Commo和Mutant reverse各0.2 μL, ddH<sub>2</sub>O 2.6 μL。利用Eppendorf公司AG22331型PCR仪进行扩增, 反应条件为: 94℃ 2 min; 94℃ 20 s、65℃ 15 s且每个循环降0.5℃、68℃ 10 s, 循环10次; 94℃ 15 s、60℃ 15 s、72℃ 10 s, 循环28次; 72℃ 2 min终止反应。(3)电泳鉴定: 取PCR扩增产物10 μL, 2%琼脂糖凝胶电泳, 用美国Protein Sample Alpha Imager HP化学发光凝胶成像系统观察拍照。

## 2 结果

### 2.1 小鼠基因型鉴定结果

小鼠鼠耳基因DNA经PCR扩增、琼脂糖凝胶电泳, 出现预期的扩增条带, 结果见图1。用Commo和Wild type reverse引物扩增显示, 野生型鼠SCAMP2<sup>+/+</sup>在153 bp处出现条带; Commo和Mutant reverse引物扩增显示, 杂合子SCAMP2<sup>+/-</sup>在153 bp和344 bp处出现条带, 而SCAMP2基因敲除的纯合子突变鼠SCAMP2<sup>-/-</sup>仅在344 bp处出现特异性条带, 与预期结果相一致。



N: 阴性对照; KO: 纯合子; WT: 野生型; HET: 杂合子; M: 100 bp DNA ladder。

图1 部分小鼠基因型PCR鉴定结果

## 2.2 基因敲除小鼠繁殖和生长情况

纯合子母鼠繁殖良好, 每胎平均产6~11只幼崽, 生长状态良好, 与野生型C57BL/6NJ小鼠相比外形特征未见明显差异, 见图2。



图2 2周龄野生型小鼠(左)和纯合型小鼠(右)

## 2.3 不同繁殖方法繁育结果

经2个月的合笼繁殖共获得198只子鼠, 其中SCAMP2基因敲除杂合子互交得23只杂合鼠、11只野生鼠、14只纯合鼠; 杂合子与纯合子正交得28只杂合鼠、24只纯合鼠; 杂合子与纯合子反交得20只杂合鼠、25只纯合鼠; 纯合子互交得53只纯合鼠。4种不同配对繁殖方式所产子代小鼠得纯合率分别为29.17%、46.15%、55.56%和100.00%, 基本符合孟德尔遗传定律。

## 3 讨论

SCAMPs(secretory carrier membrane proteins)是高尔基体及后期高尔基体循环转运中的一类载体蛋白, 参与细胞内物质到细胞表面的运输过程, 能加速胞膜重构, 影响胞吐/胞吞融合孔的形成、稳定及扩张<sup>[6-8]</sup>。SCAMPs属于动植物体内的保守蛋白, 包括在哺乳动物体内普遍存在的SCAMP 1~4, 以及特异表达于神经元的SCAMP 5。SCAMP2是由SCAMP2基因编码的一种39 KDa蛋白<sup>[9]</sup>, 是SCAMPs蛋白家族主要成员之一。人SCAMP2基因定位于染色体15q23-q25, 不同物种SCAMP2的分子质量几乎相同。与其他囊泡转运膜蛋白一样, SCAMP2也以复合体形式存在<sup>[10]</sup>。SCAMP2能与ADP-核糖化作用因子6(ADP-ribosylation factor 6, ARF6)及磷脂酶D1(phospholipase D1, PLD1)共定位, 将ARF6招募至DCV(dense core vesicle)的融合位点而激活PLD, 进而促进胞吐融合孔的形成<sup>[11-12]</sup>。在膜融合过程中, 质膜SCAMP2和分泌囊泡SCAMP2协同合作。而表

达于分泌囊泡及质膜接近区的SCAMP2可能是潜在的外排融合位点。质膜上的SCAMP2在膜受到去极化作用刺激时, 加速融合孔打开, 以维持胞吐作用顺利进行。基因敲除SCAMP2阻止了胞吐过程的起始阶段<sup>[13]</sup>, 胞质中SCAMP2 N末端特异性的缺失突变, 减少了囊泡转运体活性<sup>[14]</sup>。

本实验采用煮沸裂解法提取基因组DNA, 测定A260/A280接近1.8, 说明所获得的DNA可满足后续PCR扩增需要。基因鉴定的反应体系及扩增条件是影响鉴定结果的关键因素, 选用Wild type reverse和Mutant reverse分两个反应体系进行PCR扩增, 实验特异性好, 获得了理想的扩增条带(见图1)。

本实验引进的SCAMP2基因敲除小鼠是Jackson实验室利用CRISPR技术<sup>[15]</sup>获得的杂合子小鼠。实验中采用SCAMP2<sup>+/-</sup>杂合子互交、SCAMP2<sup>+/-</sup>杂合子与SCAMP2<sup>-/-</sup>纯合子正交及反交、SCAMP2<sup>-/-</sup>纯合子互交4种繁殖方法, 经过2个月的观察, 发现SCAMP2基因敲除对小鼠的繁殖能力没有明显影响, 子代小鼠的纯合率分别为29.17%、46.15%、55.56%和100.00%, 基本符合孟德尔遗传定律。通过对不同年龄阶段野生鼠、杂合鼠和纯合鼠的观察, 发现3种基因型小鼠在体质量及外形上无明显区别, 摄食饮水良好、性格活泼好动, 无脱毛萎靡不振等现象。为了短期内获得大量纯合子, 可以采用纯合子互交的繁育方法。目前本实验已获得135只SCAMP2基因敲除纯合子小鼠, 这为后续研究SCAMP2在囊泡运输过程中的作用奠定了实验基础。另外, 本实验观察发现, 要减少繁殖鼠食子事件的发生, 应确保繁殖鼠性成熟年龄、环境安静及食物充足。同时, 为提高受孕率和繁殖率, 也可适当给予繁殖鼠葵花籽及垫棉等。繁殖后应及时分笼, 即可避免同笼子鼠生存环境拥挤, 也可防止代际混乱和交配混乱。

## 参考文献:

- [1] Lin G. Insights of high-density lipoprotein apolipoprotein-mediated lipid efflux from cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 291(4): 727-731.
- [2] Ma W, Lin M, Ding H, et al.  $\beta$ -COP as a component of transport vesicles for HDL apolipoprotein-mediated cholesterol exocytosis [J]. *PLoS ONE*, 2016, 11(3): e0151767.
- [3] Weng J, Yang Y, Wang W. Lipid regulated conformational dynamics of the longin SNARE protein Ykt6 revealed by molecular dynamics simulations [J]. *J Phys Chem A*, 2015, 119(9): 1554-1562.

[4] Liao H, Zhang J, Shestopal S, et al. Nonredundant function of secretory carrier membrane protein isoforms in dense core vesicle exocytosis [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2008, 294(3): C797-C809.

[5] Zaarour N, Defontaine N, Demaretz S, et al. Secretory carrier membrane protein 2 regulates exocytic insertion of NKCC2 into the cell membrane [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(11): 9489-9502.

[6] Guo Z, Liu L, Cafiso D, et al. Perturbation of a very late step of regulated exocytosis by a secretory carrier membrane protein (SCAMP2)-derived peptide [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(38): 35357-35363.

[7] Castle A, Castle D. Ubiquitously expressed secretory carrier membrane proteins (SCAMPs) 1-4 mark different pathways and exhibit limited constitutive trafficking to and from the cell surface [J]. *J Cell Sci*, 2005, 118 (16): 3769-3780.

[8] Muller H K, Wiborg O, Haase J. Subcellular redistribution of the serotonin transporter by secretory carrier membrane protein 2 [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(39): 28901-28909.

[9] Singleton D R, Wu T T, Castle J D. Three mammalian SCAMPs (secretory carrier membrane proteins) are highly related products of distinct genes having similar subcellular distributions [J]. *J Cell Sci*, 1997, 110(17): 2099-2107.

[10] Wu T T, Castle J D. Evidence for colocalization and interaction between 37 and 39 kDa isoforms of secretory carrier membrane proteins (SCAMPs) [J]. *J Cell Sci*, 1997, 110(13): 1533-1541.

[11] Liu L, Liao H, Castle A, et al. SCAMP2 interacts with Arf6 and phospholipase D1 and links their function to exocytotic fusion pore formation in PC12 cells [J]. *Mol Biol Cell*, 2005, 16(10): 4463-4472.

[12] Ischebeck T, Seiler S, Heilmann I. At the poles across kingdoms: Phospho- inositides and polar tip growth [J]. *Protoplasma*, 2010, 240(1-4): 13-31.

[13] Liao H, Zhang J, Shestopal S, et al. Nonredundant function of secretory carrier membrane protein isoforms in dense core vesicle exocytosis [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2008, 294(3): C797-C809.

[14] Diering G H, Church J, Numata M. Secretory carrier membrane protein 2 regulates cell-surface targeting of brain-enriched Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger NHE5 [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(20): 13892-13903.

[15] Shalem O, Sanjana N E, Zhang F. High-throughput functional genomics using CRISPR-Cas9 [J]. *Nat Rev Genet*, 2015, 16(5): 299-311.

(上接第612页)

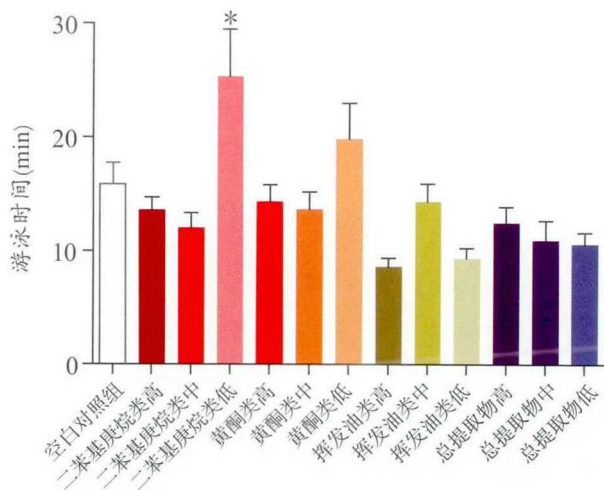


图7 小鼠负重游泳时间

庚烷类化合物是以1, 7-二苯基庚烷为母核的线性或环状结构，它们分子中均含有酚羟基结构。由此推测，高良姜中抗氧化相关活性物质主要为酚羟基化合物。该研究结果可为高良姜药用资源开发利用提

供实验依据。

参考文献：

[1] 吕玮, 蒋伶活. 高良姜的化学成分及药理作用[J]. *中国药业*, 2006, 15(3): 19-21.

[2] 严波, 白筱璐, 胡竟一, 等. 高良姜的解热和抗炎作用[J]. *中药药理与临床*, 2013, 29(1): 85-87.

[3] 程远, 李近, 廖小丹, 等. 高良姜不同活性部位对兔离体肠管平滑肌的影响[J]. *广东医学院学报*, 2015, 33(6): 649-652.

[4] 邓亦峰, 冯丽娜, 罗辉. 辛辣组分对高良姜提取物抗菌活性的影响[J]. *食品研究与开发*, 2013, 34(4): 4-7.

[5] 冯丽娜, 邓亦峰, 梁念慈. 高良姜中芳香类化合物的分离及其活性研究[J]. *时珍国医国药*, 2009, 20(11): 2732-2733.

[6] Harwood L M. Dry-column flash chromatography[J]. *Aldrichimica Acta*, 1985, 18(1): 25.

[7] 李彩君, 陈佃, 何瑞. 高良姜中二苯基庚烷类化合物研究进展[J]. *时珍国医国药*, 2000, 11(4): 367-368.